

## نقش سورفاکتانت آنیونی در ایجاد تنش اکسیداتیو در اکوسیستم‌های آبی و اثر آن بر رشد گیاه آزولا (*Azolla filiculoides*)

زهرا مسعودیان<sup>۱</sup>، سید یحیی صالحی لیسار<sup>۲</sup>، اکبر نورسته‌نیا<sup>۳\*</sup>

تاریخ دریافت: خرداد ۹۷

تاریخ پذیرش: مهر ۹۷

### چکیده

مصرف گسترده سورفاکتانت‌ها در بسیاری از زمینه‌های صنعتی و تجاری و تخلیه فاضلاب‌های حاوی این ترکیبات به اکوسیستم‌های آبی، حیات آبزیان را به مخاطره انداخته است. این ترکیبات به مولکول‌های زیستی مختلف از قبیل پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و لیپیدها متصل شده هستند و با افزایش تولید گونه‌های اکسیژن فعال موجب تخریب ساختار سلول می‌شوند. از این رو در مطالعه حاضر ابتدا تاثیر غلظت‌های ۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ mg/L سورفاکتانت آنیونی الکیل بنزن سولفونات خطی به مدت ۷ روز بر شدت تنش اکسیداتیو ایجاد شده در گیاه آبی *Azolla filiculoides* بر اساس شاخص مالون دی‌آلدئید بررسی شد. تغییرات برخی شاخص‌های رشد شامل میزان کلروفیل کل و شاخص پایداری غشا و همچنین محتوای آنتی‌اکسیدانی گیاه شامل کارتنوئید کل، آنزیم کاتالاز، محتوای فنلی و پرولین آزاد مورد بررسی قرار گرفتند. کمترین میزان کلروفیل کل و شاخص پایداری غشا و بیشترین میزان مالون دی‌آلدئید و پرولین آزاد در غلظت ۴۰ mg/L از سورفاکتانت مشاهده شد. با این وجود میزان فنل کل کمتر تحت تاثیر غلظت‌های سورفاکتانت قرار گرفت. به این ترتیب، حضور غلظت‌های ۳۰ تا ۴۰ mg/L و بالاتر سورفاکتانت ظهور تنش اکسیداتیو و القای اثرات مهاری بر برخی شاخص‌های رشد را به دنبال خواهد داشت.

**واژگان کلیدی:** *Azolla filiculoides*، الکیل بنزن سولفونات خطی، تنش اکسیداتیو، سورفاکتانت آنیونی.

۱- دانشجوی دکتری فیزیولوژی گیاهی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

۲- دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

۳- دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

\* نویسنده مسئول: [norasteh@guilan.ac.ir](mailto:norasteh@guilan.ac.ir)

## مقدمه

هستند (Dirilgen and Ince, 1995). از پرکاربردترین سورفاکتانت‌های آنیونی می‌توان به آلکیل بنزن سولفونات خطی (LAS)<sup>۲</sup> اشاره کرد. LAS یک ترکیب نیست، بلکه مجموعه‌ای متشکل از ۲۰ ترکیب از همولوگ‌ها و ایزومرهای نزدیک است. به علت هزینه کم تولید و داشتن خواص فیزیکوشیمیایی مطلوب، LAS یکی از متداول‌ترین سورفاکتانت‌های مورد استفاده در شوینده‌های خانگی به شمار می‌آید. حجم وسیعی از LAS مصرفی از طریق پساب‌های خانگی و فاضلاب‌های صنعتی به اکوسیستم‌های آبی راه می‌یابند که موجب آلودگی وسیع محیط‌های آبی می‌شوند (Liu and Wu, 2018a). مصرف زیاد مواد شوینده موجب افزایش غلظت این گروه از آلاینده‌ها در سیستم‌های آبی می‌شود. در مطالعات پیشین تجمع سورفاکتانت‌ها در رسوبات رودخانه (Rico-Rico et al., 2009)، فاضلاب‌ها، رسوبات دریایی و آب‌های زیرزمینی (Field et al., 1992) و همچنین آب دریا (Leon et al., 2004) به طور مکرر گزارش شده است. حضور سورفاکتانت‌ها در محیط زیست اثرات مخربی برای موجودات زنده ایجاد

سورفاکتانت‌ها ترکیبات انسان‌زاد<sup>۱</sup> هستند که باعث تغییر کشش سطحی بین فازهای مختلف از جمله مایعات، جامدات و گازها می‌شوند. این ترکیبات از نظر شیمیایی، خواص متنوعی از قبیل پخش‌کنندگی، امولسیون‌کنندگی، مرطوب‌کنندگی، شویندگی و ضدعفونی‌کنندگی دارند به همین دلیل در مصارف خانگی، صنعتی، کشاورزی و پزشکی کاربرد فراوانی دارند (Planas et al., 2002). سالانه بالغ بر ۱۵ میلیارد تن سورفاکتانت تولید می‌شود و انتظار می‌رود تا سال ۲۰۲۰ چهار درصد بر این مقدار افزوده شود. به دلیل استفاده گسترده از سورفاکتانت‌ها و همچنین نرخ پایین تجزیه آن‌ها در شرایط بی‌هوازی، از سورفاکتانت‌ها می‌توان به عنوان شاخص مولکولی برای بررسی آلودگی‌های ناشی از فعالیت‌های انسانی استفاده کرد (Li et al., 2018b).

سورفاکتانت‌ها با توجه به بار گروه هیدروفیل و ساختار مولکولی به گروه‌های آنیونی، کاتیونی، آمفوتریک و غیریونی طبقه بندی می‌شوند. تقریباً ۷۰ درصد سورفاکتانت‌های مورد استفاده از نوع آنیونی

2- Linear Alkylbenzene Sulfonate

1- Anthropogenic

می‌کند. مطالعات نشان داده است که سورفاکتانت‌های آنیونی می‌توانند به بیومولکول‌های فعال مانند نشاسته، پروتئین‌ها، پپتیدها و DNA متصل شوند ( Marques et al., 2000). همچنین اتصال این ترکیبات به لیپیدها و پروتئین‌های غشا بر ساختار و یکپارچگی غشاهای لیپیدی تاثیر می‌گذارد و با تغییر ماهیت پروتئین‌های غشا، موجب اختلال در عملکرد آن‌ها می‌شوند ( Cserhati et al., 2002).

به علت کاربرد وسیع سورفاکتانت‌ها تاکنون پژوهش‌های زیادی در زمینه سمیت این ترکیبات صورت گرفته است. مطالعات پیشین بیشتر بر اثرات مخرب سورفاکتانت‌ها بر میکروارگانیسم‌ها از جمله باکتری‌ها ( Lima et al., 2011)، میکرو جلبک‌ها ( Qv and Jiang, 2013) و همچنین جانوران آبی ( Pettersson et al., 2000) و ماهی‌ها ( Susmi et al., 2010) متمرکز شده است. بررسی‌ها در زمینه سمیت این ترکیبات بر گیاهان آبی و پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی این گروه از گیاهان محدود است. اثرات مضر سورفاکتانت‌ها بر گیاهان آبی موارد متعددی از جمله کاهش میزان رشد و تعداد گیاه ( Dirilgen and al., 1989) را شامل می‌شود. یافته‌های Dirilgen و Ince (۱۹۹۵) نشان داده است که نوع محیط کشت و میزان سورفاکتانت SDS<sup>۱</sup> موجود در آن در پاسخ‌های رشدی و میزان انباشت SDS در گیاه آبی *Lemna minor* اثر می‌گذارد. همچنین بررسی‌های میکروسکوپ الکترونی حاکی از تغییرات ریخت‌شناسی در سلول‌های اپیدرمی برخی از گیاهان آبی در حضور سورفاکتانت‌های مختلف است ( Chawla et al., 1989).

آزولا یک نهانزاد آوندی کوچک است که معمولاً در آب‌های راکد و آرام نهرها، تالاب‌ها و شالیزارهای مناطق گرمسیری، نیمه گرمسیری و معتدل رشد می‌کند. این گیاه با باکتری

می‌کند. مطالعات نشان داده است که سورفاکتانت‌های آنیونی می‌توانند به بیومولکول‌های فعال مانند نشاسته، پروتئین‌ها، پپتیدها و DNA متصل شوند ( Marques et al., 2000). همچنین اتصال این ترکیبات به لیپیدها و پروتئین‌های غشا بر ساختار و یکپارچگی غشاهای لیپیدی تاثیر می‌گذارد و با تغییر ماهیت پروتئین‌های غشا، موجب اختلال در عملکرد آن‌ها می‌شوند ( Cserhati et al., 2002).

به علت کاربرد وسیع سورفاکتانت‌ها تاکنون پژوهش‌های زیادی در زمینه سمیت این ترکیبات صورت گرفته است. مطالعات پیشین بیشتر بر اثرات مخرب سورفاکتانت‌ها بر میکروارگانیسم‌ها از جمله باکتری‌ها ( Lima et al., 2011)، میکرو جلبک‌ها ( Qv and Jiang, 2013) و همچنین جانوران آبی ( Pettersson et al., 2000) و ماهی‌ها ( Susmi et al., 2010) متمرکز شده است. بررسی‌ها در زمینه سمیت این ترکیبات بر گیاهان آبی و پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی این گروه از گیاهان محدود است. اثرات مضر سورفاکتانت‌ها بر گیاهان آبی موارد متعددی از جمله کاهش میزان رشد و تعداد گیاه ( Dirilgen and

1- Sodium Dodecyl Sulfate

اثرات مضر آن بر برخی شاخص‌های بیوشیمیایی *Azolla filiculoides* پرداخته است.

#### مواد و روش‌ها تهیه نمونه

نمونه *Azolla filiculoides* از تالاب سوسان واقع در لاهیجان (N 14° 0' 50" و E 26° 12' 37") تهیه شد. نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی دانشکده علوم پایه دانشگاه گیلان، ابتدا با آب کاملاً شسته شدند و به مدت ۲ دقیقه در محلول NaClO (۰/۵٪) قرار داده شدند تا ضدعفونی شوند و در ادامه با آب شهر و آب مقطر شستشو شدند. برای کشت *A. filiculoides* محیط کشت فاقد نیتروژن و گنر (Wagner, 1997) مورد استفاده قرار گرفت. ترکیبات این محیط کشت در جدول ۱ آورده شده است. بعد از کشت، گیاهان در اتاقک کشت با شرایط دمایی  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  و دوره روشنایی- تاریکی ۱۶:۸ ساعت به مدت یک هفته در آزمایشگاه نگهداری شدند. پس از پایان دوره کشت، شرایط تیماردهی اعمال شد. به این ترتیب که ۵ تیمار با افزودن غلظت‌های مختلف ۰ (شاهد)، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ mg/L

تثبیت‌کننده ازت *Anabaena azolla* رابطه همزیستی دارد (Masood et al., 2006). پراکنش وسیع این گیاه در سراسر دنیا، رشد سریع و نرخ بالای تثبیت نیتروژن آن، توجه بسیاری از پژوهشگران را به خود جلب کرده است. گیاه آزولا اولین بار در سال ۱۹۸۶ از کشور فیلیپین به ایران وارد شد و به دلیل داشتن توانایی تثبیت نیتروژن به عنوان کود برای مزارع برنج مورد استفاده قرار گرفت. گیاه آزولا سهم به‌سزایی در تامین غذای ماهیان گیاهخوار و دام داشته است و در کاهش جوانه زنی بذر علف‌های هرز موجود در مزارع برنج نیز بسیار موثر است (Hashemloian and Azimi, 2009). همچنین این گیاه توانایی بالایی در جذب فلزات سنگین سرب، کادمیوم، مس و روی (Arora et al., 2006; Jafari et al., 2010)، مواد رنگ‌زا (Al-Baldawi et al., 2018; Kooh et al., 2018) و آنتی‌بیوتیک (Gomes et al., 2018) از پساب‌ها دارد. با توجه به اهمیت اکولوژیکی و اقتصادی گیاه آبی آزولا و احتمال بالای آلودگی محیط زیست این گیاه به سورفاکتانت‌ها، مطالعه حاضر به بررسی میزان تنش اکسیداتیو ایجاد شده تحت تاثیر غلظت‌های مختلف سورفاکتانت آنیونی LAS و

دستگاه اسپکتروفتومتر ( M501 Single Beam UV/Visible, Camspec, انگلستان) خوانده شد. مقدار جذب آلدئیدهای غیراختصاصی در طول موج ۶۰۰ نانومتر تعیین شد و از میزان جذب در ۵۳۲ نانومتر کم شد. برای محاسبه غلظت MDA از ضریب خاموشی  $1\text{cm}^{-1}\text{mmol}^{-1}$  استفاده شد و در نهایت مقدار MDA برحسب نانومول در گرم وزن تر محاسبه شد (رابطه ۱) ( Heath and Packer, 1968).

SDBS<sup>۱</sup> (Sigma, آمریکا) که نوعی آلکیل بنزن سولفانات خطی (LAS) با زنجیره آلکیل ۱۲ کربنه است، به محیط کشت وگنر فاقد نیتروژن در سه تکرار تهیه شد و به هریک از تیمارها ۴ گرم گیاه آزولا اضافه شد. در ادامه ظروف حاوی محیط کشت و آزولا برای یک دوره ۷ روزه به اتاقک کشت با شرایط دمایی  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  و دوره روشنایی- تاریکی ۸:۱۶ ساعت منتقل شدند.

#### اندازه‌گیری مالون دی‌آلدئید

برای سنجش پراکسیداسیون لیپیدهای غشا، غلظت مالون دی‌آلدئید (MDA) به عنوان محصول پراکسیداسیون اسیدهای چرب غشا اندازه‌گیری شد. بدین منظور ۵۰۰ mg بافت تر گیاه با تری‌کلرو استیک اسید (TCA) ۱٪ هموژنیزه شد. سپس به آن محلول TCA ۲۰٪ حاوی تیوباربتوریک اسید (TBA) ۰/۵٪ اضافه شد. مخلوط حاصل ابتدا به مدت ۳۰ دقیقه در دمای  $100^\circ\text{C}$  قرار داده شد و سپس بلافاصله سرد شد و مجدداً سانتریفیوژ (14-1، Sigma، آمریکا) شد. بعد از جداسازی عصاره رویی جذب کمپلکس MDA+TBA موجود در آن در طول موج ۵۳۲ نانومتر توسط

1- Sodium Dodecyl Benzene Sulphonate

جدول ۱: ترکیبات مورد استفاده در تهیه محیط کشت فاقد نیتروژن و گنر

غلظت (μM)	ترکیب عناصر میکرو	غلظت (mM)	ترکیب عناصر ماکرو
۰/۲۷	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	۱/۶۵	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O
۱/۱۳	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	۱	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O
۰/۰۸	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	۰/۶۵	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O
۰/۱۹	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	۰/۵	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
۰/۰۵	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	۱/۶۵	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O
۰/۰۸	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O		
۵/۷۷	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>		

شد. از عصاره رویی برای سنجش محتوای پروتئین کل و آنزیم کاتالاز استفاده شد.

سنجش مقدار پروتئین کل به روش برادفورد انجام شد (Bradford, 1976). سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز با روش Chance و Maehly (۱۹۵۵) و بر اساس کاهش جذب پراکسید هیدروژن در طول موج ۲۴۰nm اندازه‌گیری شد. محلول واکنش شامل عصاره آنزیمی، بافر فسفات (۵۰mM با pH ۷) و پراکسید هیدروژن (۱۰mM) بود. تغییرات جذب نمونه‌ها در طول موج ۲۴۰nm توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد. در نهایت فعالیت آنزیم بر اساس ضریب خاموشی ( $\epsilon=39/4\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) محاسبه و بر حسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین بیان شد. یک واحد

رابطه ۱:

$$C_{\text{MDA}} (\text{nmol/gFW}) = A / \epsilon B$$

$$A = A_{600} - A_{532}$$

$A_{600}$ : جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر؛  $A_{532}$ : جذب در طول موج ۵۳۲؛ B: عرض کووت (۱ سانتی‌متر)؛  $\epsilon$ : ضریب خاموشی ( $\text{mmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (۱۵۵<sup>۱</sup>).

#### اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز

به منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)، ۵۰۰mg بافت تر گیاه با نیتروژن مایع هموژنیزه شد. سپس به آن بافر استخراج که شامل  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  با غلظت ۱۰ میلی‌مولار و پلی‌ونیل پیرولیدین (PVP) ۱٪ بود (Chance and Maehly, 1955)، افزوده شد و نمونه در دمای ۴°C سانتریفیوژ

1- Polyvinyl Pyrrolidone

ناین هیدرین و استیک اسید خالص افزوده شد. نمونه‌ها به مدت یک ساعت در دمای  $100^{\circ}\text{C}$  قرار گرفتند و سپس به حمام یخ منتقل شدند. به هر نمونه تولوئن اضافه شد. جذب لایه فوقانی (حاوی تولوئن و پرولین) در طول موج  $520\text{nm}$  خوانده شد. مقدار پرولین با استفاده از منحنی استاندارد پرولین ( $0-10\mu\text{g/L}$ ) تعیین و در نهایت مقدار پرولین بر حسب میکروگرم بر گرم وزن تر بیان شد.

#### سنجش کلروفیل و کاروتنوئید کل

به منظور اندازه‌گیری محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی (کلروفیل کل و کاروتنوئید کل)  $100\text{mg}$  بافت تر گیاه در استون  $80\%$  هموژنیزه شد. نمونه به مدت  $24$  ساعت در تاریکی و دمای  $4^{\circ}\text{C}$  قرار گرفت و سپس سانتریفیوژ شد. جذب عصاره رویی در طول موج‌های  $470$ ،  $645$  و  $663$  نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. در نهایت مقدار رنگیزه‌ها بر اساس روش Lichtenthaler (۱۹۸۷) تعیین و بر حسب میکروگرم بر گرم وزن تر گزارش شد.

#### اندازه‌گیری شاخص پایداری غشا

شاخص پایداری غشا بر اساس میزان نشت الکتروولیت از غشا اندازه‌گیری شد. بدین منظور

مقدار آنزیمی است که بتواند یک میکرومول پراکسید هیدروژن را در زمان یک دقیقه احیا کند.

#### سنجش غلظت فنل کل

به منظور اندازه‌گیری غلظت فنل کل،  $100\text{mg}$  نمونه تر گیاهی با متانول  $80\%$  هموژنیزه و سپس سانتریفیوژ شد. عصاره رویی به دست آمده برای سنجش فنل کل مورد استفاده قرار گرفت. برای سنجش میزان فنل کل روش Singleton و Slinkard (۱۹۷۷) مورد استفاده قرار گرفت. مخلوط واکنش حاوی  $100\mu\text{L}$  عصاره متانولی،  $2800\mu\text{L}$  آب مقطر،  $2000\mu\text{L}$  کربنات سدیم  $2\%$  و  $100\mu\text{L}$  فولین  $50\%$  بود. پس از  $30$  دقیقه قرار گرفتن در تاریکی، جذب نمونه‌ها در طول موج  $763\text{nm}$  خوانده شد. همزمان محلول‌های استاندارد گالیک اسید در محدوده ( $0-100\text{mg/L}$ ) تهیه شد. مقدار فنل کل نمونه‌ها بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن تر محاسبه شد.

#### سنجش پرولین

برای اندازه‌گیری پرولین از روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) استفاده شد.  $500\text{mg}$  بافت تر گیاه با محلول  $3\%$  سولفوسالیسیلیک اسید هموژنیزه شد. سپس به عصاره، معرف اسیدی

Kolmogorov-Smirnov استفاده شد. مقایسه میانگین داده‌ها در سطح اطمینان ۹۵ درصد و با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و پس-آزمون دانکن انجام شد. انحراف از میانگین داده‌ها به وسیله خطای استاندارد (SE) نشان داده شد. برای تحلیل آماری داده‌ها از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۱) و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Microsoft Excel 2013 استفاده شد.

### نتایج

#### تاثیر LAS بر میزان مالون دی‌آلدهید

بررسی‌ها نشان داد که با افزایش غلظت LAS غلظت مالون دی‌آلدهید به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی در گیاه آزولا افزایش یافت. به طوری که در غلظت  $40 \text{ mg/L}$  LSA غلظت مالون دی‌آلدهید به بیشترین مقدار ( $8/9 \text{ nmol/g FW}$ ) رسید (شکل ۱).

#### تاثیر LAS بر فعالیت آنزیم کاتالاز

تیمار آزولا با LAS به ویژه در غلظت‌های ۱۰ و  $20 \text{ mg/L}$  بر فعالیت آنزیم کاتالاز تاثیر معنی‌دار داشت (شکل ۲). بیشترین فعالیت این آنزیم در غلظت  $20 \text{ mg/L}$  مشاهده شد. در

$200 \text{ mg}$  بافت تر گیاه به قطعات کوچک حدود  $4 \text{ mm}$  تقسیم شدند. سپس نمونه‌ها به داخل لوله‌های آزمایش حاوی  $10 \text{ mL}$  آب مقطر دیونیزه منتقل شد. لوله‌ها داخل حمام آب گرم در دمای  $32^\circ\text{C}$  به مدت ۲ ساعت نگهداری شدند. پس از گذشت ۲ ساعت هدایت الکتریکی اولیه ( $E_1$ ) با دستگاه EC-متر (EC-400L، STEK، کره جنوبی) اندازه‌گیری شد. سپس لوله‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای  $120^\circ\text{C}$  قرار گرفتند تا تمام الکترولیت‌های داخل نمونه آزاد شوند. در ادامه لوله‌ها تا دمای  $25^\circ\text{C}$  سرد شد و هدایت الکتریکی ثانویه ( $E_2$ ) اندازه‌گیری شد. در نهایت با استفاده از رابطه‌های ۲ و ۳ میزان نشت الکترولیت (EL) و شاخص پایداری غشا (MS) محاسبه شد (Dionisio-Sese and Tobita, 1998).

رابطه ۲:

$$EL(\%) = EC_1 / EC_2 \times 100$$

رابطه ۳:

$$MS(\%) = 100 - EL$$

#### تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی و با سه تکرار انجام شد. برای ارزیابی نرمال بودن داده‌ها از آزمون One Sample



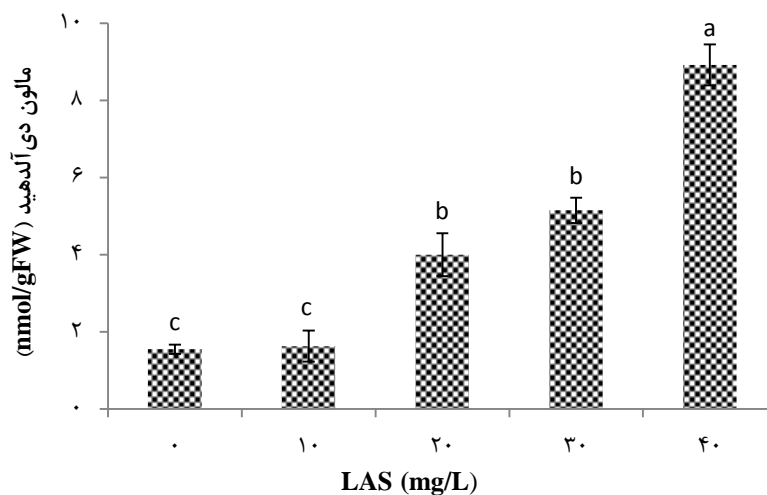
غلظت‌های ۳۰ و ۴۰ mg/L میزان فعالیت آنزیم اگرچه نسبت به نمونه شاهد بیشتر بود ولی نسبت به غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ mg/L مقادیر آن کاهش معنی‌داری یافت.

#### تاثیر LAS بر غلظت فنل کل

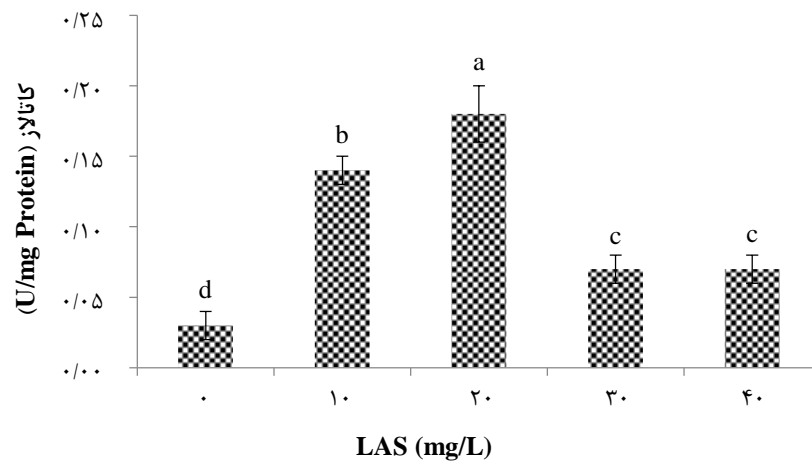
بررسی‌ها نشان داد که غلظت فنل کل گیاه آزولا در پایان روز هفتم و در تمامی غلظت‌های به کار رفته LAS نسبت به نمونه شاهد افزایش معنی‌دار یافت (شکل ۴).

#### تاثیر LAS بر غلظت کاروتنوئید کل

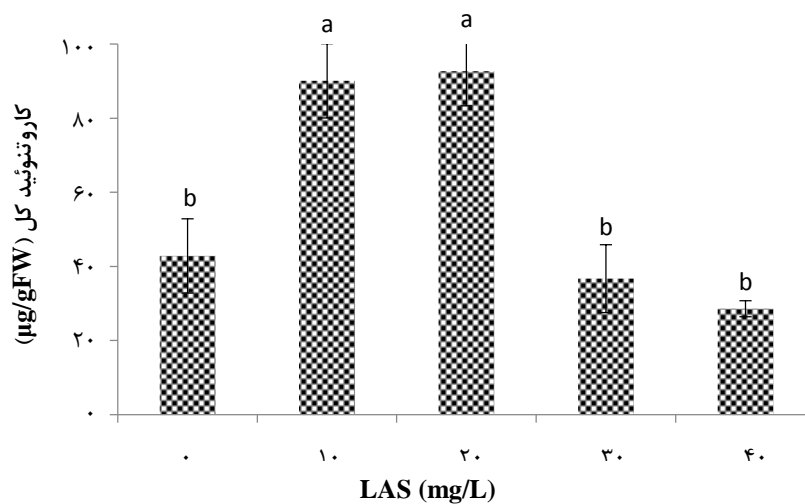
تیمار گیاه آزولای با غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ mg/L از LAS پس از ۷ روز سبب افزایش معنی‌داری در مقدار کاروتنوئید کل نسبت به نمونه شاهد شد. در حالی که در غلظت‌های ۳۰



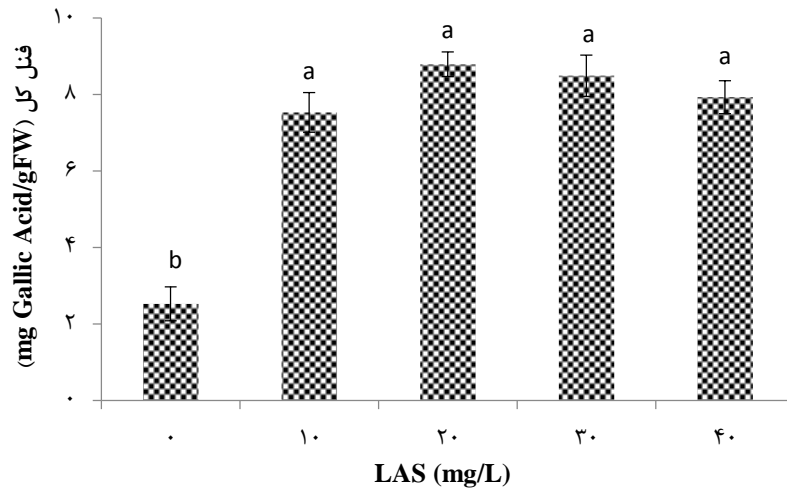
شکل ۱: غلظت مالون دی‌آلدئید در گیاه *Azolla filiculoides* تیمار شده با غلظت‌های مختلف LAS پس از یک دوره ۷ روزه (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد؛  $n=3$ ). حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ( $P \leq 0.05$ ).



شکل ۲: تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز گیاه *Azolla filiculoides* تیمار شده با غلظت‌های مختلف LAS پس از یک دوره ۷ روزه (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد؛  $n=3$ ). حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ( $P \leq 0.05$ ).



شکل ۳: تغییرات کاروتنوئید کل در گیاه *Azolla filiculoides* تیمار شده با غلظت‌های مختلف LAS پس از یک دوره ۷ روزه (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد؛  $n=3$ ). حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ( $P \leq 0.05$ ).



شکل ۴: تغییرات فنل کل در گیاه *Azolla filiculoides* تیمار شده با غلظت‌های مختلف LAS پس از یک دوره ۷ روزه (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد؛  $n=3$ ). حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ( $P \leq 0.05$ ).

تأثیر معنی‌داری داشت، در حالی که تیمار با غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ mg/L نتوانست تغییر معنی‌داری را در مقدار کلروفیل کل در مقایسه با نمونه شاهد ایجاد کند (شکل ۶).

#### نتایج تأثیر LAS بر شاخص پایداری غشا

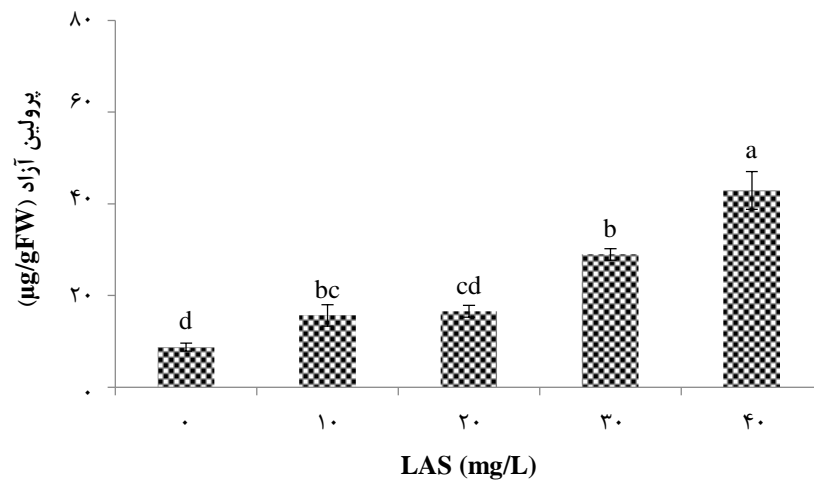
با افزایش غلظت LAS در گیاه آزولا، شاخص پایداری غشا در مقایسه با نمونه شاهد به تدریج کاهش یافت. این کاهش معنی‌دار به ویژه در غلظت ۴۰ mg/L نسبت به سایر غلظت‌ها با اختلاف بیشتری دیده شد (شکل ۷).

#### تأثیر LAS بر پرولین آزاد

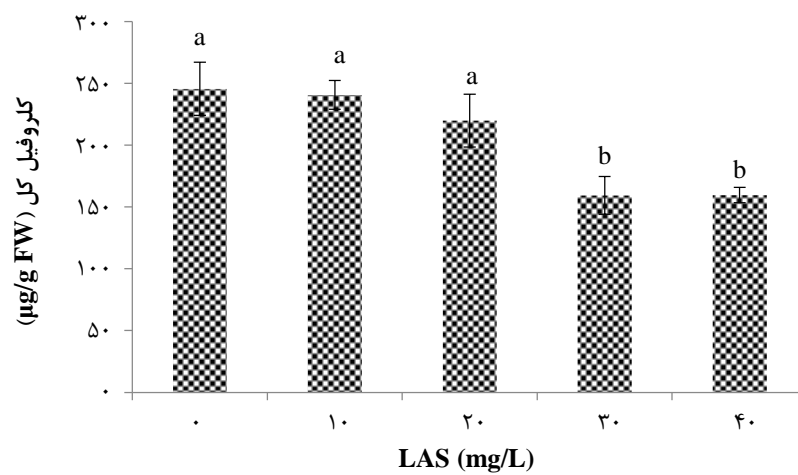
نتایج مربوط به اندازه‌گیری مقدار پرولین آزاد گیاه آزولا در غلظت‌های مختلف LAS نشان داد که افزایش غلظت این ماده سبب افزایش غلظت پرولین آزاد در مقایسه با نمونه شاهد شد. بیشترین مقدار پرولین آزاد در گیاهان تیمار شده با غلظت ۴۰ mg/L مشاهده شد (شکل ۵).

#### تأثیر LAS بر غلظت کلروفیل کل

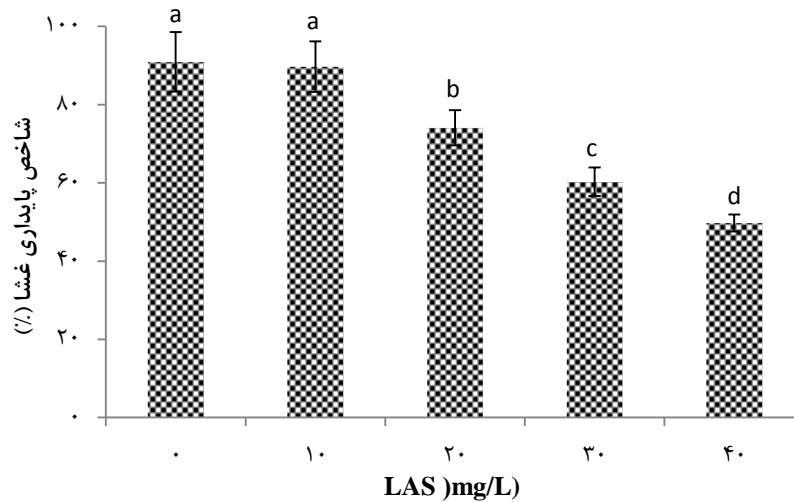
تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها نشان داد که تیمار LAS به ویژه در غلظت‌های ۳۰ و ۴۰ mg/L بر مقدار کلروفیل کل گیاه آزولا



شکل ۵: تغییرات پروتئین آزاد در گیاه *Azolla filiculoides* تیمار شده با غلظت‌های مختلف LAS پس از یک دوره ۷ روزه (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد؛  $n=3$ ). حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ( $P \leq 0.05$ ).



شکل ۶: تغییرات کلروفیل کل در گیاه *Azolla filiculoides* تیمار شده با غلظت‌های مختلف LAS پس از یک دوره ۷ روزه (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد؛  $n=3$ ). حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ( $P \leq 0.05$ ).



شکل ۷ شاخص پایداری غشا در گیاه *Azolla filiculoides* تیمار شده با غلظت‌های مختلف LAS پس از یک دوره ۷ روزه (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد؛  $n=3$ ). حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ( $P \leq 0.05$ ).

مثبت و با غلظت مالون دی‌آلدهید و پرولین آزاد همبستگی منفی داشت. پایداری غشا با غلظت کاروتنوئید و پرولین آزاد همبستگی مثبت داشت. غلظت فنل با غلظت مالون دی‌آلدهید همبستگی مثبت و با غلظت کلروفیل و فعالیت آنزیم کاتالاز همبستگی منفی داشت.

#### بحث

در زمینه اثرات بیوشیمیایی سورفاکتانت‌ها بر آبزیان به ویژه جلبک‌ها و جانوران آبی

بررسی میزان همبستگی بین شاخص‌های اندازه‌گیری شده

بر اساس داده‌های جدول ۲ غلظت سورفاکتانت LSA با غلظت مالون دی‌آلدهید، پرولین آزاد و فنل همبستگی مثبتی در سطح ۰/۰۱ داشت و با غلظت کلروفیل کل و فعالیت آنزیم کاتالاز همبستگی منفی نشان داد. غلظت مالون دی‌آلدهید با غلظت کلروفیل کل و کاروتنوئید همبستگی منفی داشت. فعالیت آنزیم کاتالاز با غلظت کلروفیل همبستگی

Basiglini et al., 2018; Liu and Wu, ) Garcia ) مطالعات زیادی صورت گرفته است ( Garcia et al., 2016; Lechuga et al., 2016; Li et al., 2018a)، اما بررسی اثرات مضر این گروه از آلاینده‌ها و بررسی مکانیسم تحمل این ترکیبات توسط گیاهان آبی محدود است

(2018b). افزایش غلظت بیگانه‌زیست‌ها (Xenobiotic) در سلول باعث افزایش تولید گونه‌های اکسیژن

جدول ۲: بررسی میزان همبستگی بین شاخص‌های اندازه‌گیری شده در گیاه آزولا

فنل	کاتالاز	پرویلین آزاد	مالون دی‌آلدهید	کاروتنوئید	کلروفیل کل
۰/۸۶۴**	-۰/۹۵۱**	۰/۶۹۵**	۰/۹۳۰**		-۰/۸۴۷**
				-۰/۵۳۶*	-۰/۷۷۷**
		-۰/۵۶۷*	-۰/۹۰۶**		۰/۸۶۹**
		۰/۵۸۴*		۰/۸۱۲**	
	-۰/۸۴۶**		۰/۸۳۴**		-۰/۷۲۹**

\*\* همبستگی در سطح ۰/۰۱؛ \* همبستگی در سطح ۰/۰۵.

مالون دی‌آلدهید همراه بود. بین غلظت سورفاکتانت با غلظت مالون دی‌آلدهید همبستگی مثبت وجود داشت (جدول ۲) این افزایش اگرچه از غلظت ۲۰ mg/L LAS به طور معنی‌داری نسبت به شاهد ظاهر شد، ولی در غلظت ۴۰ mg/L به بالاترین مقدار خود رسید و نشان داد که تنش ناشی از غلظت ۴۰ mg/L با تنش‌های حاصل از غلظت‌های دیگر به طور معنی‌داری متفاوت بود. اگر نسبت گونه‌های اکسیژن فعال به آنتی‌اکسیدان‌های در دسترس خیلی بیشتر باشد شرایطی به نام

فعال (ROS) و تخریب سلول از طریق اختلال در فرآیندهای فیزیولوژیکی می‌شود. در واقع ROSها منجر به اکسیداسیون مولکول‌های زیستی، آسیب به پروتئین‌ها، لیپیدها، اسیدهای نوکلئیک و همچنین رنگدانه‌های فتوسنتزی به ویژه کلروفیل می‌شوند ( Gill and Tuteja, 2010). همان طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، افزایش تنش ناشی از غلظت‌های مختلف LAS با افزایش مقادیر

#### 1- Reactive Oxygen Species

تنش اکسیداتیو رخ می‌دهد (Rinalducci et al., 2008). مالون دی‌آلدهید یکی از محصولات پراکسید شدن لیپیدها طی تنش اکسیداتیو است و مقدار آن نشان دهنده شدت آسیب به غشا به علت افزایش تولید ROS است (Thounaojam et al., 2012). افزایش تولید مالون دی‌آلدهید در طی تنش LAS در *Chara vulgaris* گزارش شده است (Liu and Wu, 2018a).

تجزیه زیستی آلاینده‌ها توسط گیاهان به وسیله فرآیندهای زیستی صورت می‌گیرد. زمانی که گیاهان در مواجهه با آلاینده‌های شیمیایی قرار می‌گیرند، آنزیم‌های موجود در سلول می‌توانند از طریق تجزیه آلاینده‌ها و تبدیل آن‌ها به متابولیت‌های دیگر سمیت آن‌ها را کاهش دهند و یا حتی منجر به حذف آن‌ها شوند (Husain, 2006). حضور آلاینده‌هایی مانند انواع علف‌کش‌ها، مواد آلی و فلزات سنگین در محیط موجب افزایش تولید رادیکال‌های اکسیژن در گیاه می‌شود. اگرچه ROSها در مقادیر بالا برای سلول آسیب‌رسان هستند، ولی این ترکیبات در علامت‌دهی (Signaling) در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیک و در مسیرهای مربوط به تغییر بیگانه‌زیست‌ها نیز نقش به‌سزایی دارند

(Ramel et al., 2012). بررسی تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز به عنوان یکی از شاخص‌های مهم سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی گیاهان نشان داد که یک همبستگی منفی بین فعالیت این آنزیم و مقادیر مالون دی‌آلدهید وجود داشت و با کاهش فعالیت این آنزیم غلظت مالون دی‌آلدهید افزایش یافت (جدول ۲). به این مفهوم که گیاه آزولا در اثر افزایش کم غلظت LAS (۱۰ و ۲۰ mg/L) فعالیت آنزیم کاتالاز را به منظور مهار تنش اکسیداتیو ارتقا داد (شکل ۲). اما در غلظت‌های بالاتر LAS (۳۰ و ۴۰ mg/L) شدت تنش و تجمع انواع اکسیژن فعال در حدی بود که با تحت تاثیر قرار دادن جنبه‌های متفاوت آنابولیسمی و کاتابولیسمی افزایش فعالیت‌های مرتبط با سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی را مهار و امکان ارتقای فعالیت کاتالاز را محدود کرد. به علاوه ممکن است تجزیه پروتئین‌های آنزیمی از جمله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به وقوع چنین وضعیتی کمک کند. در بررسی که در سال ۲۰۱۱ توسط Radic و همکاران بر اثرات سمی Al و Zn بر روی گیاه آبزی *Lemna minor* صورت گرفت کاهش در فعالیت آنزیم کاتالاز مشاهده شد که دلیل این کاهش ممانعت از ساخت آنزیم و یا ممانعت از اتصال

اکسیداتیو را می‌توان به ماهیت لیپیدی آن‌ها نسبت داد که اهداف اولیه رادیکال‌های آزاد اکسیژن محسوب می‌شوند ( Krinsky and Deneke, 1982).

محتوای فنل کل به عنوان یکی دیگر از عوامل دفاع آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی، در تمامی سطوح تیمار با LAS با افزایش محسوس همراه بود. افزایش فنل کل در هنگام تنش ناشی از حضور سورفاکتانت را می‌توان به فعال شدن آنزیم‌های مسیر بیوسنتز آن‌ها نسبت داد که پاسخی هدفمند به شرایط تنش است. مطالعات Zezulka و همکاران (۲۰۱۳) نشان داد که تنش‌های شیمیایی با افزایش محتوای فنلی موجب افزایش سختی دیواره سلولی در بافت زمینه‌ای و آوندی ریشه گیاه می‌شود. بنابراین حضور مقادیر بالای فنل در دیواره سلولی جذب و انتقال بیگانه‌زیست‌ها را در سلول سخت‌تر می‌کند و از گیاه در برابر اثرات منفی آلاینده‌ها محافظت می‌کند. همچنین یافته‌ها نشان داده است که پراکسیدازهای موجود در سلول از ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها به عنوان دهنده الکترون برای احیا  $H_2O_2$  استفاده می‌کنند که این موضوع از نقش آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات در شرایط تنش اکسیداتیو حمایت می‌کند

زیرواحدهای این آنزیم در شرایط حضور آلاینده تلقی شده است ( Radic et al., 2011). Liu و همکاران (۲۰۰۴) نیز به تغییر فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاهان *Lemna paucicostata* و *Azolla imbricate* در معرض سورفاکتانت اشاره کردند.

مطالعه حاضر نشان داد که تنها غلظت‌های پایین LAS موجب افزایش میزان کارتنوئید کل شد. در حالی که غلظت‌های بالای LAS با القای اثرات مهاری و بازدارنده در مسیر بیوسنتز کارتنوئیدها و یا افزایش میزان تجزیه آن‌ها موجب کاهش این رنگدانه‌ها شد. در چنین شرایطی آزولا امکان استفاده از این آنتی‌اکسیدان‌ها را در حفاظت از متابولیسم و به ویژه تجهیزات فتوسنتزی در برابر رادیکال‌های آزاد اکسیژن از دست می‌دهد ( Behera et al., 2002). بنابراین می‌توان اظهار داشت که احتمالاً یکی از عوامل کاهش کلروفیل کل در غلظت‌های بالای LAS، کاهش مقدار کارتنوئید کل است که باعث اختلال در کارایی فتوسنتزی و عملکرد حفاظتی گیاه شده است. Dai و همکاران (۲۰۰۶) نیز آسیب دیدن رنگدانه کلروفیل را به کاهش کارتنوئیدها در گیاه آزولا در معرض کادمیوم نسبت دادند. حساسیت کارتنوئیدها به شدت بالای تنش



(Teisseire and Vernet, 2000). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که گیاه در شرایط تنش اکسیداتیو با بالا بردن میزان ترکیبات فنلی در واقع تعداد گروه‌های هیدروکسیل موجود در محیط واکنش را افزایش می‌دهد و قدرت پاکسازی رادیکال‌های آزاد را ارتقا می‌بخشد. اما افزایش فعالیت ترکیبات فنلی نیز تا زمانی امکان‌پذیر است که متابولیسم توسط افزایش رادیکال‌های آزاد محدود نشده باشد. یافته‌های Forni و همکاران (۲۰۱۲) در زمینه تاثیر غلظت‌های مختلف سورفاکتانت آنیونی سدیم دودسیل سولفات (SDS) بر گیاه آزولا نشان داد که مقدار فنل کل در روز سوم تیماردهی افزایش و در روز هفتم کاهش پیدا کرد. آن‌ها علت افزایش یافتن فنل کل را به زیاده‌تر شدن فعالیت فنیل آلانین آمونیاکاز و علت کاهش مقدار فنل کل را به کم شدن فعالیت این آنزیم به دلیل سمیت ناشی از تجمع SDS در گیاه نسبت دادند. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که توان بقا و ساخت ترکیبات فنلی نسبت به کاروتنوئیدها بالاتر است و در حضور غلظت‌های مورد استفاده LAS در این مطالعه می‌تواند نقش آنتی‌اکسیدانی خود را ایفا کند (Forni et al., 2012).

در مطالعه حاضر گیاه آزولا در پاسخ به افزایش غلظت LAS در محیط، میزان پرولین را به طور قابل توجهی افزایش داد. شرایط نامساعد محیطی می‌تواند از طریق افزایش بیان آنزیم‌های بیوسنتز کننده پرولین و کاهش فعالیت آنزیم‌های تخریب کننده آن، باعث افزایش میزان پرولین در گیاه شود (Serraj and Sinclair, 2002). افزایش مقدار پرولین در گیاه آزولا تحت تنش پرتو UV توسط Masood و همکاران (۲۰۰۸) مشاهده شده است. پرولین به عنوان واسطه تنظیمات اسمزی، پایدار کننده ساختارهای زیرسلولی، پاک کننده رادیکال‌های آزاد، منبع انرژی و یک علامت مرتبط با تنش، نقشی چندگانه در این شرایط ایفا می‌کند. همچنین تجمع پروتئین‌های غنی از پرولین بر عملکرد آن‌ها اثر گذاشته، باعث حفاظت آن‌ها در برابر تنش اکسیداتیو می‌شود (Jaleel et al., 2007). در مطالعه حاضر به نظر می‌رسد که گیاه آزولا با افزایش میزان پرولین سعی در خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد تولید شده و تنظیم فشار اسمزی برای مقابله با نشت الکترولیت ایجاد شده دارد. می‌توان نتیجه گرفت که پرولین محصول تنش نیست بلکه ترکیب فعال و

که در مطالعات Masood و همکاران (۲۰۰۶)، (۲۰۰۸) در دو گونه آزولا در شرایط تنش خشکی و تیمار با UV به آن اشاره شده است. بر پایه نتایج این پژوهش LAS برای کمترین غلظت برای ایجاد اثرات سمی بر روی *Azolla filiculoides* به ترتیب ۲۰ و ۴۰ mg/L بود که از طریق آسیب اکسیداتیو به غشاهای سلولی خسارت وارد کرده، باعث نشت الکترولیت‌ها، ناپایداری غشا و کاهش رنگدانه‌های اصلی و کمکی فتوسنتزی شد. گیاه آزولا از استراتژی‌های سلولی مختلف مانند فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنزیمی (کاتالاز) و آنتی‌اکسیدانی‌های غیرآنزیمی (کارتونوئیدها، پرولین و فنل) برای دفاع در برابر تنش اکسیداتیو ایجاد شده بهره گرفت. احتمالاً این متابولیت‌ها را می‌توان به عنوان پاسخ‌های شاخص در برابر تنش LAS در نظر گرفت.

#### تشکر و قدردانی

نگارندگان این مقاله ضمن سپاس فراوان از دانشگاه گیلان بابت تامین امکانات آزمایشگاهی، از دانشگاه تبریز به خاطر حمایت مالی قدردانی می‌نمایند.

تعیین کننده در فیزیولوژی حفاظتی تنش محسوب می‌شود.

در این مطالعه کاهش معنی‌دار کلروفیل کل به ویژه در غلظت‌های بالای سورفاکتانت مشاهده شد. به نظر می‌رسد که کاهش مقدار کاروتنوئیدها و یا کم شدن فعالیت آنزیم کاتالاز می‌تواند بخش مهمی از دلایل احتمالی افت مقدار کلروفیل‌ها باشد. اگرچه مهار بیوسنتز کلروفیل در حضور شوینده‌ها می‌تواند ناشی از تأثیرات منفی این ترکیبات بر سنتز پروتئین نیز باشد. به اثرات منفی برخی از سورفاکتانت‌ها بر کاهش میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی، در مطالعات پیشین نیز اشاره شده است (Chawla et al., 1989).

بیشترین مقدار مالون دی‌آلدهید و کمترین پایداری غشا در نمونه‌های تیمار یافته با غلظت ۴۰ mg/L مشاهده شد. سورفاکتانت‌ها قادر هستند با مولکول‌های زیستی (به ویژه فسفولیپیدهای غشایی) برهم‌کنش داشته باشند و با قرار گرفتن در اجزای سلولی مختلف موجب اختلال در عملکرد آن‌ها شوند (Masakorala et al., 2008). تحت تاثیر قرار گرفتن فسفولیپیدهای غشایی و به دنبال آن غشاهای زیستی عامل اصلی در ناپایداری غشای سیتوپلاسمی و نشت الکترولیت‌ها است

## منابع

- Al-Baldawi I.A., Abdullah S.R.S., Anuar N. and Hasan H.A. 2018.** Phytotransformation of methylene blue from water using aquatic plant (*Azolla pinnata*). *Environmental Technology and Innovation*, 11: 15–22.
- Arora A., Saxena S. and Sharma D.K. 2006.** Tolerance and phytoaccumulation of chromium by three *Azolla* species. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(2): 97–100.
- Basiglini E., Pintore M. and Forni C. 2018.** Effects of treated industrial wastewaters and temperatures on growth and enzymatic activities of duckweed (*Lemna minor* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 153: 54–59.
- Bates L.S., Waldren R.P. and Teare I.D. 1973.** Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil*, 39: 205–207.
- Behera R.K., Mishra P.C.H. and Choudhury N.K. 2002.** High irradiance and water stress induce alterations in pigment composition and chloroplast activities of primary wheat leaves. *Plant Physiology*, 159: 967–973.
- Bradford M.M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2): 248–254.
- Chance B. and Maehly A.C. 1955.** Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology*, 2: 764–775.
- Chawla G., Mirsra V., Viswasantha P.N. and Devi S. 1989.** Toxicity of linear alkyl benzene sulphonate on some aquatic plants. *Water, Air and Soil Pollution*, 43: 41–51.
- Cserhati T., Forgacs E. and Oros G. 2002.** Biological activity and environmental impact of anionic surfactants. *Environment International*, 28: 337–348.
- Dai L.P., Xiong Z.T., Huang Y. and Li M.J. 2006.** Cadmium-induced changes in pigments, total phenolics, and phenylalanine ammonia-lyase activity in fronds of *Azolla imbricata*. *Environmental Toxicology*, 21(5): 505–512.
- Dionisio-Sese M.L. and Tobita S. 1998.** Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. *Plant Science*, 135(1): 1–9.
- Dirilgen N. and Ince N. 1995.** Inhibition effect of the anionic surfactant SDS on duckweed, *Lemna minor* with considerations of growth and accumulation. *Chemosphere*, 31(9): 4185–4196.
- Field J.A., Leenhee J.A., Thorn K.A., Barber II L.B., Rostad C.,**

- Macalady D.L. and Daniel S.R. 1992.** Identification of persistent anionic surfactant-derived chemicals in sewage effluent and groundwater. *Journal of Contaminant Hydrology*, 9(1-2): 55-78.
- Forni C., Braglia R., Harrenb F.J.M. and Cristescu S.M. 2012.** Stress responses of duckweed (*Lemna minor* L.) and water velvet (*Azolla filiculoides* Lam.) to anionic surfactant sodium-dodecyl-sulphate (SDS). *Aquatic Toxicology*, 110-111: 107-113.
- Garcia M.T., Kaczerewska O., Ribosa I., Brycki B., Materna P. and Drgas M. 2016.** Biodegradability and aquatic toxicity of quaternary ammonium-based gemini surfactants: Effect of the spacer on their ecological properties. *Chemosphere*, 154: 155-160.
- Gill S.S. and Tuteja N. 2010.** Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48: 909-930.
- Gomes M.P., De Brito J.C.M., Carneiro M.M.L.C., Da Cunha M.R.R., Garcia Q.S. and Figueredo C.C. 2018.** Responses of the nitrogen-fixing aquatic fern *Azolla* to water contaminated with ciprofloxacin: Impacts on biofertilization. *Environmental Pollution*, 232: 293-299.
- Hashemloian B.D. and Azimi A.A. 2009.** Alien and exotic *Azolla* in northern Iran. *African Journal of Biotechnology*, 8(2): 187-190.
- Heath R.L. and Packer L. 1968.** Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125(1): 189-198.
- Husain Q. 2006.** Potential applications of the oxidoreductive enzymes in the decolorization and detoxification of textile and other synthetic dyes from polluted water: A review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 26(4): 201-221.
- Jafari N., Senobari Z. and Pathak R.K. 2010.** Biotechnological potential of *Azolla filiculoides*, *Azolla microphylla* and *Azolla pinnata* for biosorption of Pb (II), Mn (II), Cu (II) and Zn (II). *Ecology, Environment and Conservation*, 16: 443-449.
- Jaleel C.A., Gopi R., Sankar B., Manivannan P., Kishorekumar A., Sridharan R. and Panneerselvam R. 2007.** Studies on germination, seedling vigour, lipid peroxidation and proline metabolism in *Catharanthus roseus* seedlings under salt stress. *South African Journal of Botany*, 73(2): 190-195.
- Kooh M.R.R., Lim L.B., Lim L.H. and Malik O.A. 2018.**

- Phytoextraction potential of water fern (*Azolla pinnata*) in the removal of a hazardous dye, methyl violet 2B: Artificial neural network modelling. *International Journal of Phytoremediation*, 20(5): 424–431.
- Krinsky N.I. and Deneke S.M. 1982.** Interaction of oxygen and oxy-radicals with carotenoids. *Journal of the National Cancer Institute*, 69(1): 205–210.
- Lechuga M., Fernandez-Serrano M., Jurado E., Nunez-Olea J. and Rios F. 2016.** Acute toxicity of anionic and non-ionic surfactants to aquatic organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 125: 1–8.
- Leon V.M., Gomez-Parra A. and Gonzalez-Mazo E. 2004.** Biodegradation of linear alkylbenzene sulfonates and their degradation intermediates in seawater. *Environmental Science and Technology*, 38(8): 2359–2367.
- Li B., Li H., Pang X., Cui K., Lin J., Liu F. and Mu W. 2018a.** Quaternary ammonium cationic surfactants increase bioactivity of indoxacarb on pests and toxicological risk to *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 149: 190–196.
- Li X., Doherty A.C., Brownawell B. and Lara-Martin P.A. 2018b.** Distribution and diagenetic fate of synthetic surfactants and their metabolites in sewage-impacted estuarine sediments. *Environmental Pollution*, 242: 209–218.
- Lichtenthaler H.K. 1987.** Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148: 350–382.
- Lima T.M., Procopio L.C., Brandao F.D., Leao B.A., Totola M.R. and Borges A.C. 2011.** Evaluation of bacterial surfactant toxicity towards petroleum degrading microorganisms. *Bioresource Technology*, 102(3): 2957–2964.
- Liu H.Y., Liao B.H., Zhou P.H. and Yu P.Z. 2004.** Toxicity of linear alkylbenzene sulfonate and alkylethoxylate to aquatic plants. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 72(4): 866–872.
- Liu N. and Wu Z. 2018a.** Toxic effects of linear alkylbenzene sulfonate on *Chara vulgaris* L. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(5): 4934–4941.
- Liu N. and Wu Z. 2018b.** Growth and antioxidant response in *Ceratophyllum demersum* L. under sodium dodecyl sulfate (SDS), phenol and joint stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 163: 188–195.

- Marques E., Miguel M., Dias R., Melnikov S., Khan A. and Lindman B. 2000.** Gel formation and association in systems of cationic surfactant vesicles and oppositely charged polymers. *Polymer Preprints*, 41: 737–738.
- Masakorala K., Turner A. and Brown M.T. 2008.** Influence of synthetic surfactants on the uptake of Pd, Cd and Pb by the marine macroalga, *Ulva lactuca*. *Environmental Pollution*, 156(3): 897–904.
- Masood A., Shah N.A., Zeeshan M. and Abraham G. 2006.** Differential response of antioxidant enzymes to salinity stress in two varieties of *Azolla* (*Azolla pinnata* and *Azolla filiculoides*). *Environmental and Experimental Botany*, 58(1-3): 216–222.
- Masood A., Zeeshan M. and Abraham G. 2008.** Response of growth and antioxidant enzymes in *Azolla* plants (*Azolla pinnata* and *Azolla filiculoides*) exposed to UV-B. *Acta Biologica Hungarica*, 59(2): 247–258.
- Pettersson A., Adamsson M. and Dave G. 2000.** Toxicity and detoxification of Swedish detergents and softener products. *Chemosphere*, 41: 1611–1620.
- Planas C., Guadayol J.M., Droguet M., Escalas A., Rivera J. and Caixach J. 2002.** Degradation of polyethoxylated nonylphenols in a sewage treatment plant. Quantitative analysis by isotopic dilution-HRGC/MS. *Water Research*, 36(4): 982–988.
- Qv X.Y. and Jiang J.G. 2013.** Toxicity evaluation of two typical surfactants to *Dunaliella bardawil*, an environmentally tolerant alga. *Environmental Toxicology*, 32: 426–433.
- Radic S., Stipanicev D., Cvjetko P., Rajcic M.M., Sirac S., Pevalek-Kozlina B. and Pavlica M. 2011.** Duckweed *Lemna minor* as a tool for testing toxicity and genotoxicity of surface waters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(2): 182–187.
- Ramel F., Sulmon C., Serra A.A., Gouesbet G. and Couee I. 2012.** Xenobiotic sensing and signalling in higher plants. *Journal of Experimental Botany*, 63(11): 3999–4014.
- Rico-Rico A., Temara A., Behrends T. and Hermens J.L.M. 2009.** Effect of sediment properties on the sorption of C12-2-LAS in marine and estuarine sediments. *Environ Pollution*, 157: 377–383.
- Rinalducci S., Murgiano L. and Zolla L. 2008.** Redox proteomics: Basic principles and future perspectives for the detection of protein oxidation in plants. *Journal of Experimental Botany*, 59(14): 3781–3801.

- Serraj R. and Sinclair T.R. 2002.** Osmolyte accumulation: Can it really help increase crop yield under drought conditions? *Plant, Cell and Environment*, 25: 333–341.
- Slinkard K. and Singleton V.L. 1977.** Total phenol analysis: Automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28(1): 49–55.
- Susmi T.S., Rebello S., Jisha M.S. and Sherief P.M. 2010.** Toxic effects of sodium dodecyl sulfate on grass carp *Ctenopharyngodon idella*. *Fish Technology*, 47: 157–162.
- Teisseire H. and Vernet, G. 2000.** Is the “Diuron effect” due to a herbicide strengthening of antioxidative defenses of *Lemna minor*? *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 66(3): 153–160.
- Thounaojam T.C., Panda P., Mazumdar P., Kumar D., Sharma G.D., Sahoo L. and Panda S.K. 2012.** Excess copper induced oxidative stress and response of antioxidants in rice. *Plant Physiology and Biochemistry*, 53: 33–39.
- Wagner G.M. 1997.** *Azolla*: A review of its biology and utilization. *The Botanical Review*, 63(1): 1–26.
- Zezulka S., Kummerova M., Babula P. and Vanova L. 2013.** *Lemna minor* exposed to fluoranthene: Growth, biochemical, physiological and histochemical changes. *Aquatic Toxicology*, 140: 37–47.



Research Paper

## The role of anionic surfactant in oxidative stress in aquatic ecosystems and its effect on *Azolla filiculoides* growth

Zahra Masoudian<sup>1</sup>, Seyed Yahya Salehi Lisar<sup>2</sup>, Akbar Norastehnia<sup>3\*</sup>

Received: June 2018

Accepted: September 2018

### Abstract

Extensive consumption of surfactants in many industrial and commercial fields and the discharge of sewage containing these compounds into aquatic ecosystems endanger aquatic life. These compounds can bind to various biological molecules such as proteins, nucleic acids and lipids. They can destroy the structure of the cell through the increased production of reactive oxygen species. Therefore, in the present study, the effect of concentrations of 0, 10, 20, 30, and 40mg/L of linear alkylbenzene sulfonate surfactant for 7 days on the intensity of oxidative stress induced in *Azolla filiculoides* was determined based on malondialdehyde index. Then changes of some growth factors including total chlorophyll content and membrane stability index as well as antioxidant content of the plant including total carotenoid, catalase, phenolic and proline content were investigated. The lowest total chlorophyll content and membrane stability index, and the highest levels of malondialdehyde and proline were observed at 40 mg/L surfactant concentration. However, total phenol content was less affected by surfactant concentrations. In conclusion, the presence of concentrations of 30-40mg/L and above surfactant will cause in oxidative stress and induction of inhibitory effects on some growth indices.

**Key words:** *Azolla filiculoides*, Linear Alkylbenzene Sulfonate, Oxidative Stress, Anionic surfactant.

1- Ph.D. Student in Plant Physiology, Faculty of Natural Sciences, Tabriz University, Tabriz, Iran.

2- Associate Professor in Department of Biology, Faculty of Natural Sciences, Tabriz University, Tabriz, Iran.

3- Associate Professor in Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

\*Corresponding Author: [norasteh@guilan.ac.ir](mailto:norasteh@guilan.ac.ir)